

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-187640

(43)Date of publication of application : 06.07.1992

(51)Int.Cl. A61K 35/74
A61K 35/74

(21)Application number : 02-315919 (71)Applicant : CHIBA SEIFUN KK
MIZUNO DENICHI
SOMA GENICHIRO

(22)Date of filing : 22.11.1990 (72)Inventor : SOMA GENICHIRO
YOSHIMURA ATSUSHI
TSUKIOKA DAISUKE
MIZUNO DENICHI
OSHIMA HARUYUKI

(54) IMMUNOLOGICAL FUNCTION PROMOTING AGENT FOR ORAL AND
TRANSCUTANEOUS ADMINISTRATION AND IMMUNOLOGICAL FUNCTION
PROMOTING AGENT FOR ANIMAL FOR ORAL AND TRANSCUTANEOUS
ADMINISTRATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an immunological function promoting agent for oral and transcutaneous administration, containing Bordetella pertussis LPS, having high immunological function activation capability and high chemotherapeutic index and producible at a low cost.

CONSTITUTION: The objective agent contains Bordetella pertussis LPS preferably having a molecular weight of 6000 ± 1000 and 9000 ± 1000 (determined by SDS electrophoresis) and containing 5 P atoms, 16 ± 2 hexosamine groups, 5 fatty acid groups and 2 ± 1 KDO based on 8,000 molecular weight. The immunological function is e.g. macrophage-activation property, especially endogenous TNF- production promoting property. The immunological function promoting activity can be further improved by the combined use of an agent for suppressing the production of prostaglandin (e.g. indomethacin).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-187640

⑪ Int. Cl.⁵

A 61 K 35/74

識別記号

ABD D
AER D

庁内整理番号

9165-4C
9165-4C

⑬ 公開 平成4年(1992)7月6日

審査請求 未請求 請求項の数 24 (全11頁)

⑭ 発明の名称 経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤

⑮ 特 願 平2-315919

⑯ 出 願 平2(1990)11月22日

⑰ 発 明 者	杉	源	一	郎	東京都世田谷区東玉川1-10-21						
⑰ 発 明 者	吉	村		淳	千葉県千葉市磯辺3-26-7						
⑰ 発 明 者	月	岡	大	輔	千葉県千葉市春日1-21-17						
⑰ 発 明 者	水	野	伝	一	神奈川県鎌倉市岡本18						
⑰ 発 明 者	大	島	治	之	東京都八王子市館町1097 館ヶ丘団地2-10-513						
⑰ 出 願 人	千	葉	製	粉	株	式	有	限	公	司	千葉県千葉市新港17番地
⑰ 出 願 人	水	野	伝	一	神奈川県鎌倉市岡本18						
⑰ 出 願 人	杉	源	一	郎	東京都世田谷区東玉川1-10-21						

明 細 書

1 発 明 の 名 称

経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤

2 特 許 請 求 の 範 囲

(1) 百日咳菌LPSを含む経口免疫機能促進剤。

(2) 百日咳菌LPSが次の物性を有するものである、請求項1記載の経口免疫機能促進剤。

分子量 = $6,000 \pm 1,000$

$9,000 \pm 1,000$

(SDS電気泳動法)

リン数 = 5 / 分子量8千

ヘキソサミン数 = 16 ± 2 / 分子量8千

脂肪酸数 = 5 / 分子量8千

KDO数 = 2 ± 1 / 分子量8千

(3) 免疫機能がマクロファージ活性化能である、請求項1又は2記載の経口免疫機能促進剤。

(4) マクロファージ活性化能が内因性TNF産生促進能である、請求項3記載の経口免疫機能促進剤。

(5) プロスタグランジン産生抑制剤を含む、請求項1～4のいずれかの項に記載の経口免疫機能促進剤。

(6) プロスタグランジン産生抑制剤がインドメタシンである、請求項5記載の経口免疫機能促進剤。

(7) 百日咳菌LPSを含む経皮免疫機能促進剤。

(8) 百日咳菌LPSが次の物性を有するものである、請求項7記載の経皮免疫機能促進剤。

分子量 = $6,000 \pm 1,000$

$9,000 \pm 1,000$

(SDS電気泳動法)

リン数 = 5 / 分子量8千

ヘキソサミン数 = 16 ± 2 / 分子量8千

脂肪酸数 = 5 / 分子量8千

KDO数 = 2 ± 1 / 分子量8千

(9) 免疫機能がマクロファージ活性化能である、請求項7又は8記載の経皮免疫機能促進剤。

(10) マクロファージ活性化能が内因性TNF産生促進能である、請求項9記載の経皮免疫機能促進剤。

(11) プロスタグランジン産生抑制剤を含む、請求項7～10のいずれかの項に記載の経皮免疫機能促進剤。

(12) プロスタグランジン産生抑制剤がインドメタシンである、請求項11記載の経口免疫機能促進剤。

(13) 百日咳菌LPSを含む動物用経口免疫機能促進剤。

(14) 百日咳菌LPSが次の物性を有するものである、請求項13記載の動物用経口免疫機能促進剤。

分子量 = 6,000 ± 1,000

9,000 ± 1,000

(SDS電気泳動法)

リン数 = 5 / 分子量8千

分子量 = 8,000 ± 1,000

9,000 ± 1,000

(SDS電気泳動法)

リン数 = 5 / 分子量8千

ヘキサミン数 = 16 ± 2 / 分子量8千

脂肪酸数 = 5 / 分子量8千

KDO数 = 2 ± 1 / 分子量8千

(21) 免疫機能がマクロファージ活性化能である、請求項19又は20記載の動物用経皮免疫機能促進剤。

(22) マクロファージ活性化能が内因性TNF産生促進能である、請求項21記載の動物用経皮免疫機能促進剤。

(23) プロスタグランジン産生抑制剤を含む、請求項17～22のいずれかの項に記載の動物用経皮免疫機能促進剤。

(24) プロスタグランジン産生抑制剤がインドメタシンである、請求項23記載の動物用経皮免疫機能促進剤。

ヘキサミン数 = 16 ± 2 / 分子量8千

脂肪酸数 = 5 / 分子量8千

KDO数 = 2 ± 1 / 分子量8千

(15) 免疫機能がマクロファージ活性化能である、請求項13又は14記載の動物用経口免疫機能促進剤。

(16) マクロファージ活性化能が内因性TNF産生促進能である、請求項15記載の動物用経口免疫機能促進剤。

(17) プロスタグランジン産生抑制剤を含む、請求項13～16のいずれかの項に記載の動物用経口免疫機能促進剤。

(18) プロスタグランジン産生抑制剤がインドメタシンである、請求項17記載の経口免疫機能促進剤。

(19) 百日咳菌LPSを含む動物用経皮免疫機能促進剤。

(20) 百日咳菌LPSが次の物性を有するものである、請求項19記載の動物用経皮免疫機能促進剤。

3 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤に関する。

より詳細には、本発明は、百日咳菌LPSを含む、経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤に関する。

[従来の技術]

生物には、生体の内部環境が外來性及び内因性の異物によって攪乱されるのを防ぎ、生体の恒常性を維持するための免疫機能が備わっている。従って、免疫機能の低下は健康の悪化、各種疾病の発病、老化促進の原因となり、その活性化は健康向上、各種疾病の発病阻止、治癒、老化防止につながる。

このため、免疫機能を活性化させる物質の提供が要請されており、現在、PS-K [別名クレステン(興羽化学株式会社登録商標)]、レンチ

ナン（味の素株式会社の登録商標）、ベスタチン（日本化薬株式会社の登録商標）、ソニフィラン（科研製薬株式会社の登録商標）、OK-432【がんサ－ケモセラピー レポートウパートウ 1 (Cancer Chemotherapy Reports Part 1), vol. 58, No. 1, 10頁(1972)、別名ピシバニール（中外製薬株式会社の登録商標）】、大腸菌LPS等が知られている。

【発明が解決しようとする課題】

従来の免疫機能活性化剤のうちで、PS-K、レンチナン、ベスタチン、ソニフィランにはTNF産生能がないので、それらの免疫機能活性化能は低い。

一方、OK-432にはTNF産生能があるが、大量投与が必要であることから、発熱、悪寒、血圧低下、血小板減少等の副作用の発生が避けられず、従って化学療法係数が小さい。更に、簡便な経口投与や経皮投与では効果がないので、投与上

粒子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する大型のアメーバ状細胞の総称である。

本発明は、これら従来技術の欠点が解消された、高い免疫機能活性化能を有す、化学療法係数が大きくかつ生産コストの低い、経口あるいは経皮で投与可能な経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤を提供するために創案されたものである。薬剤を注射剤としてではなく、経口あるいは経皮で投与できることによる患者への利点は言うまでもない。注射に伴う苦痛から解放されるにとどまらず、自宅での投薬が可能になることに伴う便利さは測り知れない。特に経口投与の場合には副作用が事実上皆無になるという効果も極めて高く評価されるものである。又、皮膚にはマクロファージが多いので、皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。

更に、本発明の経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤の免疫機能促進能は、インドメタシン（1986年に廣川書店より発行された第11改訂「日本薬局方解説書」のC

の便宜に欠ける。

又、大腸菌LPS等の菌界源LPSの中には、マクロファージ活性化能を有するものがあることが知られているが、いずれも静脈投与によるものであり、経口ないし経皮投与によってもそれらがマクロファージ活性化能を発揮するとの発表、或はその可能性を暗示する発表は未だない。従来の菌界源LPSは静脈投与でないとマクロファージ活性化能を示さないというのが当業界での常識であると言える。

ここで「TNF」とは、マクロファージにより産生される腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor)の総称【ザジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry, 260, 2345~2354頁(1985年)】であり、マクロファージの活性が高まるにつれてその産生量は増していく。

「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、

212~217頁)、イブプロフェン(同C-184~189頁)、フェニルブタゾン(同C-13391343頁)、メフェナム酸(同C-1594~1597頁)等その他のプロスタグランジン産生抑制剤の投与により更に高まることも確認された。

従って、本発明の目的は、高い免疫機能活性化能を持つ、化学療法係数が大きくかつ生産コストの低い経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

本発明の経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤に含まれる百日咳菌LPSは、例えば、フナコシ薬品から市販されているものでも、或は、公知の百日咳菌、例えば、東浜博1相面の死菌体から、例えば、下記文献記載の公知方法により調製することもできる。

ウェブスター(Websler)等著の「ジェイ、イミューノロジー(J. Immunology), 74

4, 55 (1955);

ウェストファル (Westphal), 等著の「ツェット・ナツールフォルシュ (Z. Naturforsch.)」, 7B, 148 (1952)。調製された百日咳菌 LPS はそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

免疫活性化能の測定

本発明の経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤の免疫活性化能は、マクロファージ活性を通じての内因性 TNF 産生促進能により確認した。

内因性 TNF 産生促進能

動物体内に TNF を産生させるためには、産生前駆（プライミング）段階と産生開始（トリガリング）段階とが必要であることは、カーズウ

ーグルミニマムエッセンシャル培地（以下、MEM 培地と表す）で育成し、 8×10^4 個の細胞が $100 \mu\text{L}$ の同上培地に含まれる様にし、96穴の平底プレートで培養する。培養条件は 37°C 、2時間、5% CO_2 、100% H_2O であり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクトノマイシン D を培地中に終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、培養液の液量を $150 \mu\text{L}$ とする。即座に、検体を適当に MEM 培地で希釈したものを $50 \mu\text{L}$ 加える（この希釈率を適宜調整し、ED₅₀を求める事ができる）。更に、最終液量 $200 \mu\text{L}$ となった L929 細胞を上記条件で18時間培養する。

細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついで0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度を

エル (Carswell) らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.) 72, 3666 ~ 3670 頁 (1975年) に報告されており、その後、各段階で使用出来る薬剤の検討もすすめられている。プライミング段階開始のために投与される薬剤が「プライマー」（内因性 TNF 産生促進剤）であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」（内因性 TNF 産生剤）である。

本発明の経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤はプライマーとして機能する。

TNF 活性は、L-929 細胞 [プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー 72, 3666 ~ 3670 頁] に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。

L929 細胞を、5% 仔牛胎児血清を加えたイ

OD_{550nm} の吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。

L929 細胞が50%生存できる検体の希釈率 (N) を求める。対照としてウサギ TNF [腫瘍障害血清 (Tumor Necrosis Serum)] を使用し、このウサギ TNF の活性 n (単位/mL) を 2.4×10^8 単位/mg/mL の TNF- α を用いて決定する。このウサギ TNF の ED₅₀ を与える希釈率 (C) を求める。

検体活性 (単位/mL) は $\frac{N}{C} \times n$ で計算する。

提供できる剤の製造方法

本発明の免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤は医薬或は動物薬製造の常法に従って、経口薬或は経皮薬として単独で、或いは他薬との配合物として処方できる。

例えば、常法の製剤技術により、散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、液剤、貼

付剤、軟膏剤、リニメント剤、ローション剤、坐剤等の形態で提供できる。又、動物用としては、更に、飼料添加剤、プレミックス製剤、飲水添加剤として調製することもできる。飼料添加剤とする場合には、粉剤が顆粒剤とすることが好ましい。又、プレミックス製剤とは、飼料との混合を容易にするために米粉などの飼料成分で希釈されたものを指す。本発明の経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・経皮免疫機能促進剤を飼料添加剤、プレミックス製剤として添加できる飼料は市販されている飼料のいずれでもよい。又、ミネラル、ビタミン、アミノ酸等の飼料添加物を含む飼料であってもよい。

これら製剤には、所望ならば、保存性、均質性を保持するために、常法により、賦形剤、保存剤、緩衝剤等の添加剤を加えることもできる。更に、矯味剤、矯臭剤、着色剤を含めることもできる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプンを使用できる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラ

水層と合わせて流水中で一晚透析後に、ロータリーエバポレータで1/10に濃縮した。これを8,000g、4℃で20分間遠心分離した。上清を分取し、酢酸ナトリウムを少量加え、0~4℃の冷エタノールを6倍量加えて-20℃で一晩放置した。4,000g、4℃で30分間遠心分離して回収した沈殿物をエタノールで2回、次いでアセトンで1回遠心洗浄し、アスピレータで乾燥させた。

残さを、20mg/mlとなるように蒸留水に懸濁し、米国ブランソン(Branson)社製のソニファイア185型で超音波処理(出力コントロール5、15分、室温)に付した。次いで2,500g、4℃で10分間遠心分離し、上清を分取した。

この上清を4℃で、米国シグマ(Sigma)社製の核酸分解酵素DNase I、Rnase Aで15~16時間処理した(最終的には10μg/mlのDNase Iと、20μg/mlのRnase Aを使用した)。更に同じ濃度の核酸分

オキシ安息香酸プロピル等のパラオキシ安息香酸エステル類、デヒドロ酢酸ナトリウム、フェノール、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン等を使用できる。緩衝剤としては、例えば、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等が使用できる。

以下、製造例、実施例、実験例により本発明を例示する。

製造例1(百日咳菌LPSの製造)

千葉県血清研究所から入手した試験用百日咳菌液(2.0×10¹⁰細胞/ml)を死菌体として用いた。

上記死菌体を25mg(乾燥重量)/mlとなるように滅菌水に懸濁した。これに等量の90%熱フェノール液(68~70℃)を添加し、68℃で1時間振盪しながら抽出した。8,000g、4℃で20分間遠心分離して水層を分取した。残りのフェノール層に、上記水層と等量の滅菌水を加えて同様の抽出を行った。得られた水層を先の

解酵素を加えて37℃で2時間加温した。次いで2,500g、4℃で10分間遠心分離し、上清を分取した。

この上清を米国ゲルマン(Gelman)社のアクロディスク(Acrodisc)を使い、孔径0.2μmで濾過した。濾液を分子篩にかけ【樹脂：米国ファルマシア(Pharmacia)社製セファロース(Sephacrose)6B、カラムサイズ=内径5cm×長さ100cm、緩衝液=10mMのトリス-HCl、10mMのNaCl(pH7.5)、流速=約3ml/cm²/時)、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせ、上記ゲルマン社のアクロディスクを使い、孔径0.2μmで濾過した。濾液をイオン交換にかけ【樹脂：米国ファルマシア(Pharmacia)社製FPLC、樹脂：米国ファルマシア社製モノQ HR10/10、緩衝液=10mMのトリス-HCl+10mMのNaCl(pH7.5)で15分洗浄し、次いで、NaCl量を165mMに増加し

て30分洗浄し、次いで、20分かけて、NaCl量が165mMから1Mの濃度勾配になるようにNaCl量を増加させながら洗浄し、次いで、1MのNaCl量で30分洗浄する、流速=2ml/分]、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせた。

合わせた画分をカラムで脱塩し[樹脂：米国ファルマシア(Pharmacia)社製セファデックスG-25ファイン(fine)、カラムサイズ=内径2cm×長さ25cm、溶出液=蒸留水]、次いで凍結乾燥した。

この凍結乾燥標品(4.50mg)に混入している可能性の最も高い物質は核酸である。そこで、紫外吸収曲線(200~400nm)をとり、260nmでの吸光度を求めた。吸光度1のときの核酸濃度が50μg/mlであることを用いて上記吸光度から核酸濃度を算出したら1%以下であった。又、SDS電気泳動では蛋白質は明確には検出されなかった。従って、検出感度を考慮すると、上記凍結乾燥標品に混入している蛋白質は高々0

~3%と推定される。従って、上記凍結乾燥標品の純度は96%以上と推定された。

百日咳菌LPSの物性

分子量

上記凍結乾燥標品を蒸留水に溶解して1mg/ml溶液を調製し、その4μlを1.5mlのトレフチューブに入れた。これに、別途、1mMのEDTAに2.5%SDS、5%メルカプトエタノール、10mMトリス塩酸(pH8.0)を加えて調製したSDS処理液1μlを加え、この混液を3分間沸騰水に浸した。ファルマシア社製のファストシステム(Phast System)を使用し、電極との間にSDS-バッファーストリップ(Buffer Strip)(ファルマシア社製)が介在せられた1μlの上記混液をゲル[ファルマシア社製のファストゲルグラデIENT(Phast Gel Gradient 8-25)に塗付し、最大電圧250v、最大電流10mAにセットして泳動を開始させた。

泳動終了後、クマシー染色と銀染色における挙動を観察した。

クマシー染色では、染色液としてファルマシア製の0.1%ファストゲルブルー(Phast Gel Blue)Rを、脱色液として、メタノール：酢酸：蒸留水(容量比3：1：6)混液を使用し、次の順序で染色・脱色を行った。

- 1)50℃で8分間染色
- 2)50℃で5分間脱色
- 3)50℃で8分間染色
- 4)50℃で10分間脱色
- 5)50℃で5分間保護(グリセロール、酢酸、蒸留水の容量比5：10：85混液)

6)乾燥

銀染色は、次の順序で行った。

- 1)50℃で2分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比5：1：4混液)で処理
- 2)50℃で2分間、洗浄液(エタノール、酢酸、蒸留水の容量比10：5：85混液)で処理
- 3)50℃で4分間、洗浄液(エタノール、酢酸

蒸留水の容量比10：5：85混液)で処理
4)50℃で6分間、増感液(8.3%ゲルタルジアルデヒド)で処理

5)50℃で3分間、洗浄液(エタノール、酢酸

蒸留水の容量比10：5：85混液)で処理

6)50℃で5分間、洗浄液(エタノール、酢酸

蒸留水の容量比10：5：85混液)で処理

7)50℃で2分間、洗浄液(脱イオン水)で処理

8)50℃で2分間、洗浄液(脱イオン水)で処理

9)40℃で13分間、0.25w/v%硝酸銀で処理

10)30℃で30秒間、洗浄液(脱イオン水)で処理

11)30℃で30秒間、洗浄液(脱イオン水)で処理

12)30℃で30秒間、現像液(0.04v/v%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナトリウム洗浄液)で処理

13) 30℃で4分間、現像液(0.04 v/v %ホルムアルデヒド+2.5 w/v %炭酸ナトリウム洗浄液)で処理

14) 50℃で2分間、反応停止液(5% v/v %酢酸)で処理

15) 50℃で3分間、保護液(酢酸、グリセロール、蒸留水の容量比10:8:85濃液)で処理

16) 乾燥

LPSは銀染色に染まるが、クマシー染色には染まらない性質を利用して染色帯を観察したら、複数観察されたクマシー染色帯のうち、分子量 $6,000 \pm 1,000$ 、 $8,000 \pm 1,000$ の位置に染色強度が最高の染色帯が観察された。

リン含有量

チェン-トリバラ(Chen-Toribara)法[チェン等著、「アナリティカル ケミストリ(Analytical Chemistry)」、vol. 28、1756~1758頁

得られた結果を次表1に示す。

表 1

OD _{820nm}	検 体
	リン酸二水素カリウム (リン換算値: μg)
0.00	0
0.17	0.25
0.64	1.0
1.13	2.5
	百日咳菌LPS(3検体) (検量線から計算した リンの重量: μg)
0.75	1.25 (54 μg 中)
1.13	1.89 (100 μg 中)
1.12	1.82 (100 μg 中)

注: 百日咳菌LPSのデータは、無機リンの混入(例えば、リン酸緩衝液に由来する)による誤差を避けるために、加熱処理をしていない

(1956年)に準拠して次の通りに行った。

前記凍結乾燥標品を蒸留水に溶解して、54又は100 μg のLPS(大腸菌LPS換算量)を含む20 μl の溶液を調製し、小試験管に入れた。20 μl の50 v/v %硫酸を添加し、160℃で2時間加熱した。次いで、20 μl の10 v/v %過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後、0.5 mlの蒸留水、次いで0.5 mlの反応試薬(1 mlの6 N硫酸、2 mlの蒸留水、2 mlの2.5 v/w %モリブデン酸アンモニウム及び1 mlの10 v/w %のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5 mlを使用)を添加して室温で30分間放置した後に、820 nmでの吸光度(OD_{820nm})を測定した。なお、検量線作製の試料としては、リン酸二水素カリウム(和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン重量としてそれぞれ0 μg 、0.25 μg 、1.0 μg 、2.5 μg を含む0.5 mlの溶液を調製して使用した。なお、リン1 gはリン酸二水素カリウム4.39 gに相当する。

対照のデータを減じた値である。

分子量を8,000に仮定して、上表の結果に基づいて1分子当たりのリン数を次式により計算すると約5になる。

$$\text{リン重量} \times 10^{-6} \times \frac{\text{分子量}}{25 \times 10^{-6}} \times \frac{1}{32}$$

ヘキサミン含有量

エルソン-モルガン(Elson-Morgan)法(東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4の377~379頁)に準拠して次の通りに行った。

前記凍結乾燥標品を蒸留水に溶解して1 mg/mlの溶液を調製し、その100 μl をスクリーキャップ付きスピッツ(イワキガラス社製)に入れ、これに100 μl の8 N HClを添加して110℃で16時間加熱した。4 N NaOHを約200 μl 添加してpH 7とした。その100 μl を分取し、別のスクリーキャップ付きスピッツに入れ、200 μl の下記試薬Aを加えた後に、

105℃で1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100μlを分取し、670μlの96%エタノールを加え、更に、67μlの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0.20~200μg/mlのN-アセチルグルコサミン(和光純薬社製)を使用した。

(試薬A) 75μlのアセチルアセトンと2.5mlの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製。

(試薬B) 1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30mlの濃塩酸と30mlの96%エタノールを混合して調製。

結果、百日咳菌LPS(仮定分子量8,000)のヘキシサミン数は 16 ± 2 /分子だった。

脂肪酸含有量

90μlの百日咳菌LPS蒸留水溶液(1mg/ml)に10μlの内部標準(0.55mMのマルガリン酸)を加えた。1.0mlの0.5Mナトリウムメチラートを加えて脂肪酸エステルの加

水分解とエステル化を行った。室温で1時間放置後に960μlの0.5NHClを加えて中和した。これに2mlのヘキサンを加えて15分間激しく攪拌した。次いで、1,000gで5分間遠心分離を行いヘキサン層を分取した。窒素ガスでヘキサンを蒸発させて、約20μlになるまで濃縮した。

このサンプルをガスクロマトグラフィー[本体:島津社製のGC8APF、キャピラリーカラム:スベルコ(Specico)社(カナダ)製FSCAP Sp2330、キャリアガス:窒素]に付して脂肪酸量を測定した。脂肪酸量測定の基準としては、第一化学薬品社製の合成リビドAである大腸菌型LA-15-PP(分子量2,000で、1分子中の脂肪酸数は6であることが知られている)を用いた。

結果、百日咳菌LPS(仮定分子量8,000)の脂肪酸数は約5/分子だった。

上記ガスクロマトグラフィーで観察されたチャートを添付図面第1図に示す。

第1図において、図示されている主要ピーク番号に対応する保持時間(分)は次の通りであった。

第1図: ピーク番号	保持時間(分)
1	2.433
2	3.028

KDO含有量

KDO(2-ケト-3-デオキシオクトネート)含有量をジフェニルアミン法[シャビール(Shaby R.)等著、アナリティカルバイオケム(Analytical Biochem.), 58(1)、123~128頁(1974年)]に準拠して次の通りに行った。

500mgのジフェニルアミン、5mlのエタノール、45mlの水酢酸、50mlの濃塩酸(全て和光純薬社製)を合わせてKDO検出試薬を調製した。その500μlに、1.05mg/mlの百日咳菌LPSを含む蒸留水250μlを合わせ、100℃の沸騰水浴中で30分間加熱後に冷水

(23℃)中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を使って420、470、630、650nmでの紫外線吸収を測定した(それぞれA₄₂₀、A₄₇₀、A₆₃₀、A₆₅₀とする)。標準試料としては、127μg/mlのKDOフアンモニウム塩[米国シグマ(Sigma)社製]を含む蒸留水250μlを使用した。

検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。

$$S = A_{420} - A_{470} + A_{630} - A_{650}$$

結果、百日咳菌LPSには 2 ± 1 /分子量8千のKDOが含まれると推定された。

以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、LPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

実施例1(錠剤)

百日咳菌LPS	0.04g
5%HPCC乳糖	178g
ステアリン酸タルク	8g

バレイシヨデンブ 14 g

以上を混和し、打錠して、0.1 mgの百日咳菌LPSを含む0.5 gの錠剤400個を調製した。

実施例2(内用錠剤)

百日咳菌LPS 1 mg
精製水 1000 ml

実施例3(軟膏剤)

百日咳菌LPS 0.1 g
精製ラノリン 80 g
黄色ワセリン 適量
1000 g

実験例1(内因性TNF産生促進能の測定)

①各群3匹のマウス(7週齢のメスC3H/He平均体重25g)に、プライマーとしての、製造例1で得られた百日咳菌LPSを1 ml当たりそれぞれ0 μg(A群)、1 μg(B群)、10

μg(C群)含む蒸留水を3日間自由に摂取させた。

②3日目に各マウスに0 μg(A-1群、B-1群、C-1群)か100 μg(A-2群、B-2群、C-2群)の前記百日咳菌LPSを溶解した200 μlの蒸留水をゾンデで強制投与した。

③その3時間後にトリガーとしてOK-432をIKE[クリニッシュ ファインハイト(Klinische Einheit)]系単位であり、IKEは0.1 mgの乾燥細菌を含む製剤量にあたる]を溶解した生理的食塩水0.2 mlを尾静脈より投与した。トリガー投与の2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として次表2に示す。

表2

飲料水中の LPS量 (μg/ml)	ゾンデでの投与量 (μg/ml)	TNF活性 (単位/ml)
0 (A群)	0 (A-1群) 100 (A-2群)	10 ^{0.44} 10 ^{0.54}
1 (B群)	0 (B-1群) 100 (B-2群)	10 ^{0.78} 10 ^{1.00}
10 (C群)	0 (C-1群) 100 (C-2群)	10 ^{0.78} 10 ^{1.50}

第2図は、表2の結果をグラフ化したものである。表2及び第2図から次の点が明白である。

①A、B、C各群において、それぞれ1群と2群のデータを比較することにより、本発明の百日咳菌LPSは無投与群と比較して、指数級数的にTNF産生能を高める。

②飲料水に配合して摂取させる場合には、経口投与というよりは、舌の皮膚を通しての経皮投与というべきものであるから、A-1群とB-1群あ

るいはC-1群との比較により、本発明の百日咳菌LPSは経皮投与によっても有意なTNF産生促進能を有する。

実験例2(プロスタグランジン産生抑制剤の併用による内因性TNF産生促進能の向上の測定)

上記実験例1において、飲料水摂取にかえて、0.5 w/v%のカルボキシメチルセルロース(CMC)と1 w/v%のツィーン20が溶解されている200 mlの生理的食塩水にインドメタシン1.5 mgを懸濁して足のつけねの皮下に投与した。その5時間後にゾンデで百日咳菌LPSを投与し、以下、実験例1と同様に処理して、各群2匹の平均として、次表3に示す結果を得た。

表 3

インドメタ シン投与量 (mg)	ゾンデでの百日咳 菌LPS投与量 (μ g / ml)	TNF活性 (単位 / ml)
0 (D群)	0	10 ^{0.58}
1.5 (E群)	0 (E-1群)	10 ^{1.84}
	1 (E-2群)	10 ^{1.39}
	10 (E-3群)	10 ^{1.42}
	100 (E-4群)	10 ^{1.91}

第3図は、表3の結果をグラフ化したものである。
表3及び第3図から、本発明の百日咳菌LPSの
TNF産生促進能が、インドメタシンの併用によ
り飛躍的に向上することが明白である。

投与量、投与間隔、毒性値

本発明の百日咳菌LPSを免疫機能活性化剤と
して、或いは、動物用免疫機能活性化剤として投
与するさいの量、投与間隔は、免疫機能活性化剤

の本質上、当然、担当医師或いは獣医師により、
患者の年齢、症状、産生TNF量から推定できる
投与効果を勘案して個別に決定されるが、100
%純度の精製極品の場合は人間の成人(60kg)
で、経口投与で1 μ g~100mg、経皮投与で
100ng~1mgが1日1回の投与量の一定の
目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動
物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの
量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物
ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安と
し、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg
当たりの量の目安とし投与できる。

百日咳菌LPS(製造例3)の毒性値LD₅₀
(1群2匹の雄BALB/Cマウス、平均体重4
5g、における平均値)は次の通りであった。

換体	LD ₅₀ / kg (mg)	
	静脈内	皮内
百日咳LPS	11	32

【発明の効果】

本発明により、高い免疫機能活性化能を持つ、
化学療法係数が大きくかつ生産コストの低い、し
かも経口ないし経皮での投与が可能な免疫機能促
進剤、動物用免疫機能促進剤が提供される。

4 図面の簡単な説明

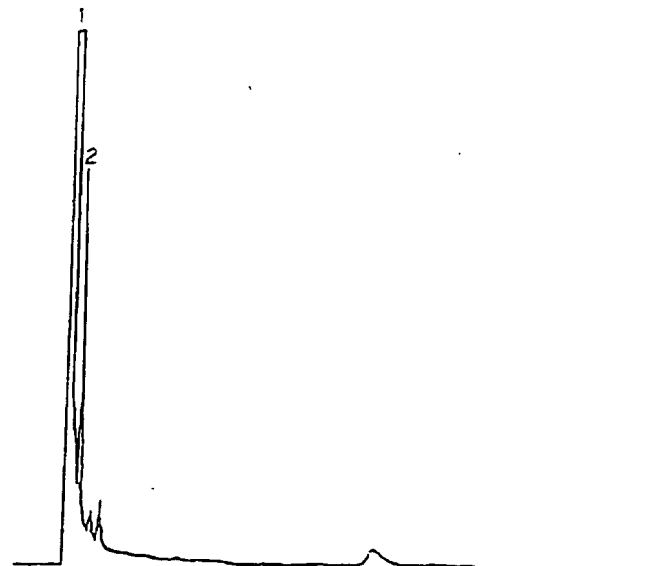
第1図は、本発明の百日咳菌LPSをガスクロ
マトグラフィーにかけて得られる、分子中におけ
る脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャート
である。

第2図は、本発明の百日咳菌LPSの免疫機能
促進能を示すグラフである。

第3図は、本発明の百日咳菌LPSの免疫機能
促進能が、プロスタグランジン産生抑制剤の併用
により向上することを示すグラフである。

図面の浄書

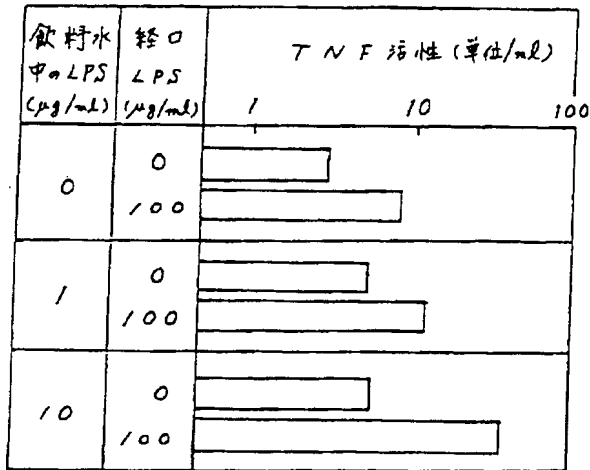
第1図



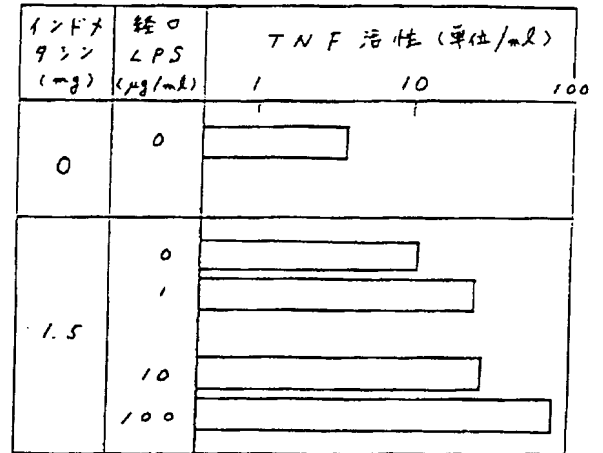
特許出願人 千葉製粉株式会社

代表者 須藤 俊彌 (ほか2名)

第 2 図



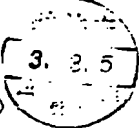

第 3 図



手 続 補 正 書 (方 式)

平成 3 年 3 月 5 日

特 許 庁 長 官 殿

1. 事件の表示 平成 2 年特許願第 3 1 5 9 1 9 号
2. 発明の名称 経口・経皮免疫機能促進剤、動物用経口・
経皮免疫機能促進剤
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人 (代表出願人) 
- 住 所 千葉県千葉市新港 1 7 番地
- 氏 名 千葉製粉株式会社
代表者 須 藤 俊 彌 
4. 補正命令の日付 発送日 平成 3 年 2 月 1 2 日
5. 補正の対象 適正な図面の欄、鮮明な図面 (全図)
6. 補正の内容 別紙の通り

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
**As rescanning these documents will not correct the image
problems checked, please do not report these problems to
the IFW Image Problem Mailbox.**